rcAAV-2/N 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1403444

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® rcAAV 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）是一款既适用于基于细胞培养法也适用于直接 qPCR 法实现对 rcAAV 检测的试剂盒；试剂盒中的参考（Reference）基因和靶（Target）基因包含在同一定量参考品中，其中 Target 基因选取 rcAAV 上两个基因的连接序列；试剂盒可同时实现对 rAAV 载体和 rcAAV 浓度快速、灵敏、特异的定量检测。

SHENTEK® rcAAV-2/N 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）适用于血清型 rAAV-2/N (N 为不同的衣壳血清型)中 rcAAV-2/N*污染率的定量检测；样品类型包括但不限于重组腺相关病毒的原液或终产品以及基于细胞培养法检测 rcAAV 的细胞样品等。

*注意，在使用本试剂盒前请务必确定：

- AAV 血清型；
- 待检测样品 rAAV 的末端重复序列（ITR）与以下序列匹配。

>rAAV-2/N 的 ITR
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA
AAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
T&R DNA 定量参考品-2	NNA027	冻干粉，1 管	-18℃及以下
Target Primer&Probe MIX-2	NNC048	200μL×1 管	-18℃及以下，避光
Reference Primer&Probe MIX-2	NNC049	200μL×1 管	-18℃及以下，避光
rcAAV qPCR Reaction Buffer	NNB009	400μL×2 管	-18℃及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5mL×4 管	-18℃及以下
ddH_2O	NND010	1.0mL×1 管	-18℃及以下

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Roche 480

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000μL，200μL，100μL，10μL RNase Free 低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000μL，200μL，100μL，10μL 移液枪

■ 操作过程

（一）待测样品的前处理

待测样品需经病毒核酸提取试剂盒提取纯化后进行检测，并需考虑以下内容：

1.设置提取过程的阴性质控 NCS；

2. 待测样品需进行核酸酶处理，以排除无蛋白衣壳保护的核酸片段的干扰。

以上具体操作详情可联系我司技术支持。

（二）待测样品提取纯化液的检测说明

本试剂盒针对直接 qPCR 法或基于细胞培养法的使用方式有所不同：

1. qPCR 快检法

① 根据检测的基因不同，需要对样品纯化液进行不同程度的稀释。

② 针对 Target 基因检测时，无需对样品纯化液进行稀释；而针对 Reference 基因检测时，需要先将样品纯化液稀释到标曲范围（2～2×10^6copies/μL）内。

例如：已知 rAAV 病毒原液的浓度约为 2E+12VG/mL，那么其样品纯化液可直接用于 Target 基因检测，但应至少稀释 1000 倍后才能用于 Reference 基因检测。

2. 基于细胞培养法

① 细胞转染前，先用 Reference 基因对 rAAV 的浓度进行测定；

注：同 1 也需要将待测样本的提取纯化液稀释到标曲范围（2～2×10^6copies/μL）内；

② 细胞转染后，再用 Target 基因对 rcAAV 的浓度进行测定。

（三）T&R DNA 定量参考品-2 的稀释及标准曲线的制备

1. T&R DNA 定量参考品-2 溶液配制：

① 第一次使用时，将 T&R DNA 定量参考品-2 管子 10000rpm/min 离心 15s；

② 离心后，准确移取 55μL ddH_2O 加至管底，溶解冻干粉。溶解后定量参考品的浓度为标签浓度。

- 为保证冻干粉充分溶解，轻弹数下混匀，短时间快速离心 3~5s，如此重复 3 次，再静置 10min 后使用。

2. T&R DNA 定量参考品-2 标准曲线制备：

① 根据 T&R DNA 定量参考品-2 标签浓度，取适量定量参考品在干净的 1.5mL 离心管中用 DNA 稀释液将其稀释至 2×10^8 copies/μL，标记为 ST。

② 取 8 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6，ST7。

③ 用 DNA 稀释液将标记为 ST 的定量参考品溶液进行 10 倍梯度稀释，可按表 2 进行稀释操作。

- 稀释过程中，振荡混匀 3-5s 后，短时间快速离心 3~5s，重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。

表 2. T&R DNA 定量参考品-2 的稀释

稀释管	稀释体积	浓度（copies/μL）
ST0	10 μL ST + 90 μL DNA 稀释液	2×10^7
ST1	20μL ST0 + 180μL DNA 稀释液	2×10^6
ST2	20μL ST1 + 180μL DNA 稀释液	2×10^5
ST3	20μL ST2 + 180μL DNA 稀释液	2×10^4
ST4	20μL ST3 + 180μL DNA 稀释液	2×10^3
ST5	20μL ST4 + 180μL DNA 稀释液	2×10^2
ST6	20μL ST5 + 180μL DNA 稀释液	2×10^1
ST7	20μL ST6 + 180μL DNA 稀释液	2×10^0

- 配制好的标曲可保存于 2-8℃，仅供当天使用。
- 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8℃。
- 若 DNA 稀释液中有析出，建议于 37℃条件下进行孵育。

（四）qPCR 反应液的制备和加样

1. 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量，计算所需反应孔数，一般做 3 重复孔/样。

Reference 基因的反应孔数 =（7 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC +3 个待测样品数+1 个阴性质控 NCS）× 3

Target 基因的反应孔数 =（7 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC +1 个待测样品数+1 个阴性质控 NCS）× 3

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量（含有 2 孔的损失量）：

- **qPCR MIX =（反应孔数+2）× 10 μL**

3. 各试剂放在冰上或 2-8℃条件下融化，并根据表 3 所示加样：

表 3. qPCR MIX 配制表

Reference 基因	
组分	单孔反应
Reference Primer&Probe MIX-2	2μL
rcAAV qPCR Reaction Buffer	8μL
总体积	10μL
Target 基因	
组分	单孔反应
Target Primer&Probe MIX-2	2μL
rcAAV qPCR Reaction Buffer	8μL
总体积	10μL

4. 上述各试剂置于冰上，混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	10μL qPCR MIX + 20μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6/ST7
无模板对照 NTC	10μL qPCR MIX + 20μL DNA 稀释液
阴性质控 NCS	10μL qPCR MIX + 20μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	10μL qPCR MIX + 20μL 待测样品提取纯化液

- 加样完成后每孔总体积为 30μL。

表 5. 96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCS-Reference	NCS-Reference	NCS-Reference				ST7-Reference	ST7-Reference	ST7-Reference	ST7-Target	ST7-Target	ST7-Target
B	NTC-Reference	NTC Reference	NTC Reference				ST6-Reference	ST6-Reference	ST6-Reference	ST6-Target	ST6-Target	ST6-Target
C	1/x S-Reference	1/x S-Reference	1/x S Reference				ST5-Reference	ST5-Reference	ST5-Reference	ST5-Target	ST5-Target	ST5-Target
D							ST4-Reference	ST4-Reference	ST4-Reference	ST4-Target	ST4-Target	ST4-Target
E							ST3-Reference	ST3-Reference	ST3-Reference	ST3-Target	ST3-Target	ST3-Target
F	NCS-Target	NCS-Target	NCS-Target				ST2-Reference	ST2-Reference	ST2-Reference	ST2-Target	ST2-Target	ST2-Target
G	NTC-Target	NTC Target	NTC Target				ST1-Reference	ST2-Reference	ST2-Reference	ST1-Target	ST1-Target	ST1-Target
H	S-Target	S-Target	S-Target									

- 该示例表示的是检测 7 个浓度梯度的 Reference 基因标准曲线（ST1～ST7）、Target 基因标准曲线（ST1～ST7）、无模板对照 NTC：NTC-Reference/Target、阴性质控 NCS：NCS-Reference/Target、待测样品 1/x S-Reference 和 S-Target。建议每个检测做 3 个重复孔。
- 实际检测时可根据样品多少，参照表 5 示例进行 96 孔板排版加样。
- 1/x S-Reference 中 x 指稀释倍数，稀释原则为：稀释后的提取纯化液需处在标曲范围（2～2×10^6copies/μL）内。

（五）上机

1．将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10s 后放入 qPCR 仪，**接着进行 qPCR 程序设置：**

① 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。两组 qPCR MIX 创建新检测探针，分别为命名为 Target-2，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none（如有）；创建新检测探针，命名为 Reference-2，选择报告荧光基团为 CY5，猝灭荧光基团为 none（如有）；检测参比荧光为 ROX（如需）。

② 设置三步法反应程序：**95℃预变性 10 min；95℃ 15 s，60℃ 30 s，72℃ 30*s（读取荧光），40 个循环；**反应体积 30 μL。

*注：所用仪器若为 ABI7500 时需将上述反应程序中的 72℃ 30s 设为 72℃ 34s。

（六）qPCR 结果分析

1．待测样品 Reference 和 Target 基因浓度的获取

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

① 在孔板编辑面板中，将标准曲线孔的样品类型一栏设置为标准品，根据表在属性一栏分别赋值，设为 2e+006、2e+005、2e+004、2e+003、2e+002、2e+001、2e+000（含义为每孔的模板浓度，单位为 copies/μL），并且在相应的样品名称一栏中命名为 Target-2 或 Reference-2。

② 在孔板编辑面板中，将无模板对照 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照，将阴性质控 NCS 孔和待测样品孔的样品类型设置为待测样品，并且在相应的样品名称一栏中命名为 NCS-Reference、NCS-Target、1/x S-Reference、S-Target。

③ 在实验分析的参数设置面板中，将各组别两种信号的基线均设置为 6-12（基线优化选择自动优化），分析类型为定量，FAM 信号手动阈值设置为 0.04，CY5 信号手动

阈值设置为 0.06，点击分析。

④ 在实验分析的标准曲线面板中，可读取各标准曲线的斜率、截距、相关系数和扩增效率。

⑤ 在实验分析的反应孔信息表面板中，浓度和平均浓度一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值，单位为 copies/μL。通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

① 在 Results 的 Amplification Plot 中，将 Reference-2 基因的 Threshold 设置为 0.06，Target-2 基因的 Threshold 设置为 0.13，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

② 在 Results 的 Plate 中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值，设为 2e+006、2e+005、2e+004、2e+003、2e+002、2e+001、2e+000（单位为 copies/μL），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 Target-2 或 Reference-2。

③ 在 Results 的 Plate 中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔和待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NCS-Reference、NCS-Target、1/x S1-Reference、S-Target 之后点击 ▶。

④ 在 Results 的 Standard Curve 中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、R^2。

⑤ 在 Results 的 Report 中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS 孔和待测样品的检测值，单位为 copies/μL。通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度。

注：上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

2. 结果分析

① 无模板对照 NTC 的 Reference-Ct 值和 Target-Ct 值应≥35 或 Undetermined。

② NCS 的 Reference-Ct 值和 Target-Ct 值也应≥35 或 Undetermined。

③ 根据分析软件给出的待测样品各检测点的浓度（copies/μL），通过稀释倍数回算出待测样品的实际浓度，并根据以下公式计算 rAAV 中 rcAAV 的污染率：

Target 基因的检测值÷（Reference 基因的检测值×稀释倍数÷2）

注：每个 rAAV 含有两个 Reference 基因

生效时间：2023 年 01 月 09 日

服务支持

湖州申科生物技术股份有限公司
www.shenkebio.com
地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼
Email：Info@shenkebio.com
电话：0572-2165910